

10.11.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 13 JAN 2005

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2004年 5月 7日

出 願 番 号
Application Number: 特願2004-138734
[ST. 10/C]: [JP2004-138734]

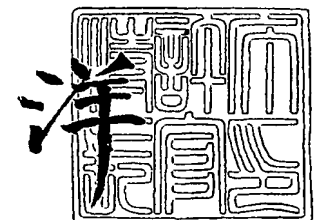
出 願 人
Applicant(s): 山岡 哲二
独立行政法人産業技術総合研究所
東洋紡績株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 3772004JP
【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特許出願
【提出日】 平成16年 5月 7日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市左京区松ヶ崎御所海道町 京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科内
 【氏名】 山岡 哲二
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
 【氏名】 常盤 豊
【発明者】
 【住所又は居所】 滋賀県大津市堅田 2 - 1 - 1 株式会社東洋紡総合研究所内
 【氏名】 北川 優
【特許出願人】
 【識別番号】 502224098
 【氏名又は名称】 山岡 哲二
【特許出願人】
 【識別番号】 301021533
 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所
 【代表者】 吉川 弘之
【特許出願人】
 【識別番号】 000003160
 【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100065215
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 三枝 英二
 【電話番号】 06-6203-0941
【選任した代理人】
 【識別番号】 100076510
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 掛樋 悠路
【選任した代理人】
 【識別番号】 100086427
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小原 健志
【選任した代理人】
 【識別番号】 100099988
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 斎藤 健治
【選任した代理人】
 【識別番号】 100105821
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 藤井 淳

【選任した代理人】
【識別番号】 100099911
【弁理士】
【氏名又は名称】 関 仁士
【選任した代理人】
【識別番号】 100108084
【弁理士】
【氏名又は名称】 中野 睦子
【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2003-379096
【出願日】 平成15年11月 7日
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 001616
【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【物件名】 新規性の喪失の例外証明書 1
【援用の表示】 変更を要しないため省略する。
【物件名】 宣誓書 3
【援用の表示】 変更を要しないため省略する。
【包括委任状番号】 9709328

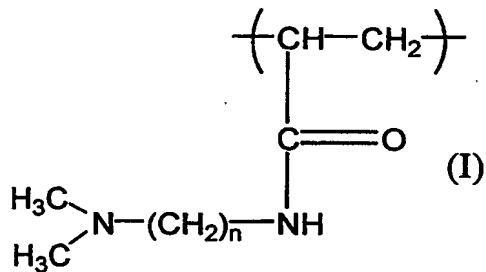
【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

カチオン性基を有する繰り返し単位 (A) 及び糖を含有する繰り返し単位 (B) を有する糖含有共重合体 (但し、下記一般式 (I) 及び (II) で表される繰り返し単位を有し、(I) と (II) のモル比率が 1 : 9 ~ 9 : 1 であって、且つ、重量平均分子量が $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^8$ である糖含有共重合体を除く。) を用いて形成される核酸分子送達用担体。

一般式 (I) :

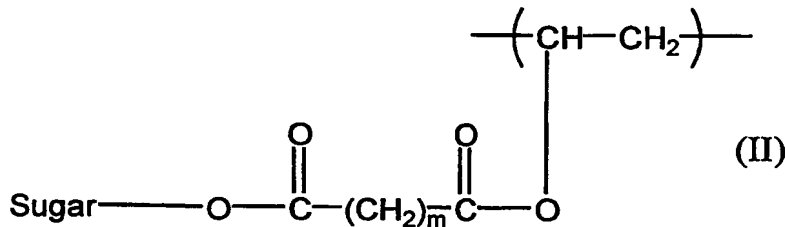
【化 1】



(式中、n は 1 ~ 10 を示す。)

一般式 (II) :

【化 2】



(式中、Sugar は糖から 1 個の NH₂ もしくは OH を除いた糖残基を示し、m は 2 ~ 10 を示す。)

【請求項 2】

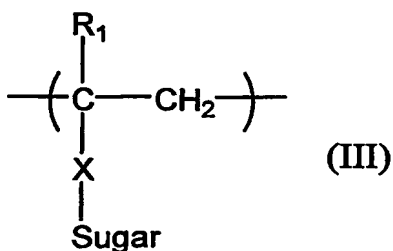
カチオン性基を有する繰り返し単位 (A)、糖を含有する繰り返し単位 (B) 及び疎水性置換基を有する繰り返し単位 (C) を有する糖含有共重合体を用いて形成される核酸分子送達用担体。

【請求項 3】

糖を含有する繰り返し単位 (B) が、下記一般式 (III) で表される繰り返し単位である請求項 1 又は 2 に記載の核酸分子送達用担体。

一般式 (III) :

【化 3】



(式中、R₁ は、-H 又は -CH₃ を示す。

Sugar は糖から 1 個の NH₂ もしくは OH を除いた糖残基を示す。

X は、-C(=O)O-、-C(=O)O-R_a-、-CONH-、-CONH-R_b-、-OC(=O)-R_c-C(=O)O-、又は -Ph-R_d-O- を示す。ここで、

R_a は $-\text{Ph}-\text{O}-$ 、又は $-(\text{CH}_2)_{n_a}-\text{O}-$ を示す。 n_a は1~10を示す。

R_b は $-\text{Ph}-\text{O}-$ 、又は $-(\text{CH}_2)_{n_b}-\text{O}-$ を示す。 n_b は1~10を示す。

R_c は $-(\text{CH}_2)_{n_c}-$ 、又は $-(\text{CH}_2)_{n_c}-\text{Ph}-(\text{CH}_2)_{n_c}-$ を示す。 n_c は2~18を示す。

R_d は $-\text{CH}_2-$ 、又は $-\text{SO}_2-$ を示す。

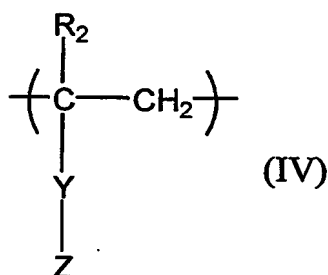
Phはフェニレン基を示す。)

【請求項4】

カチオン性基を有する繰り返し単位(A)が、下記一般式(IV)で表される繰り返し単位である請求項1~3のいずれかに記載の核酸分子送達用担体。

一般式(IV)：

【化4】



(式中、 R_2 は、H又は CH_3 を示す。

Yは、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_{n_y}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{n_y}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{n_y}-\text{C}(=\text{O})$ 、又は $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_{n_y}-$ を示す。 n_y は1~10を示す。

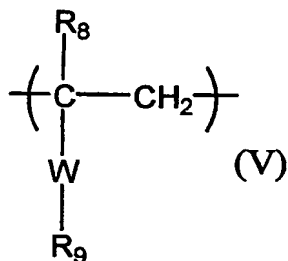
Zは、 $-\text{NR}_3\text{R}_4$ (R_3 及び R_4 は、各々同一または異なって炭素数1~10の炭化水素基を示す。)、 $-\text{N}^+\text{R}_5\text{R}_6\text{R}_7$ (R_5 、 R_6 及び R_7 は、各々同一または異なって炭素数1~10の炭化水素基を示す。)、又は窒素含有複素環式基を示す。)

【請求項5】

疎水性置換基を有する繰り返し単位(C)が、下記一般式(V)で表される繰り返し単位である請求項2~4のいずれかに記載の核酸分子送達用担体。

一般式(V)：

【化5】



(式中、 R_8 は、 $-\text{H}$ 又は $-\text{CH}_3$ を示す。

Wは $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{n_w}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、又は $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}$ を示す。 n_w は1~18を示す。

R_9 は、炭素数3~30の炭化水素基を示す。)

【請求項6】

糖含有共重合体における繰り返し単位(A)と繰り返し単位(B)のモル比率がA:B=1:99~99:1である、請求項1~5のいずれかに記載の核酸分子送達用担体。

【請求項7】

糖含有共重合体における繰り返し単位(A)+繰り返し単位(B)に対する繰り返し単位(C)のモル比率がA+B:C=99.9:0.1~0.1:99.9である、請求項2

～ 6 のいずれかに記載の核酸分子送達用担体。

【請求項 8】

糖含有共重合体の重量平均分子量が 1 万～ 1 0 0 万である請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の核酸分子送達用担体。

【書類名】明細書

【発明の名称】核酸分子送達用担体

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖含有共重合体から形成される核酸分子送達用担体に関する。

【背景技術】

【0002】

最近注目されている遺伝子治療では、患者の体内から取り出した細胞に培養系で外来遺伝子を導入し、形質転換細胞を増殖させた後に患者に再移植する「Ex vivo遺伝子導入法」が主として実施されている。この場合、患者から単離できる細胞は限られているため、多くの場合、末梢血リンパ球が利用されている。しかし、ターゲットとなる細胞は、その対象疾患によって異なり、特に体細胞や臓器組織の細胞をターゲットとする場合には、外来遺伝子をコードするプラスミドDNAを直接生体に投与する必要がある（In vivo遺伝子導入法）。

【0003】

In vivo遺伝子導入法は、多くの研究者によって検討が行われており、遺伝子を効率よく生体内に導入し、安全性が確保できる核酸分子送達用担体の開発が強く望まれている。

【0004】

一方、米国FDAにより認可されている、遺伝子治療プロトコルの85%以上においては、アデノウイルスやレトロウイルスなどが使用されている（非特許文献1参照）。ウイルスによる遺伝子導入効果は極めて高く、有効であるが、米国で実施された遺伝子治療においてはウイルスに対する免疫反応が原因と考えられる事故が起こるなど、ウイルス増殖などの危険性が指摘されていた。

【0005】

そのため、カチオニックリポソーム（非特許文献2参照）やカチオンポリマー（非特許文献3及び非特許文献4参照）などの非ウイルス性担体を核酸分子送達用担体として用いることが検討されてきた。具体的には、従来、ジエチルアミノエチルデキストラン（DEAE-dex）やポリ-L-リジン（PLL）などの直鎖状ポリカチオンが検討されてきた。

【0006】

ポリカチオンの遺伝子発現効率はリポソームより低い、リポソームに比べて生体内に直接投与したときに肝臓に集積する傾向が少なく、体内動態のコントロールが比較的容易であるという利点がある。しかし、ポリカチオンの一つで、従来、核酸分子送達用担体として精力的に検討されてきたポリ-L-リジンは、遺伝子導入能の効率が低い。

【0007】

このような問題に鑑み、本発明者らは、特定の構造を有する糖含有共重合体並びに該糖含有共重合体から形成される核酸分子送達用担体に関する技術を発明し、先に特許出願を行ったが（特許文献1参照）、遺伝子発現効率の更なる向上などが求められていた。

【特許文献1】特開2004-26866号

【非特許文献1】Annu.Rev.Microbiol., 49, 807, 1995

【非特許文献2】Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84, 7413, 1987

【非特許文献3】Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 92, 7297, 1995

【非特許文献4】Bioconjugate Chem., 6, 7, 1995

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、糖含有共重合体から形成される、遺伝子発現効率に優れた核酸分子送達用担体を提供することを主な目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、遺伝子発現を効率的に行うことができる核酸分子送達用担体について鋭意

研究した結果、特定の構造を有する糖含有共重合体を用いて形成する場合に、優れた効果を奏する核酸分子送達用担体が見出され、更に鋭意検討を重ねて本発明を完成するに至った。

【0010】

即ち、本発明は、以下の核酸分子送達用担体に係る。

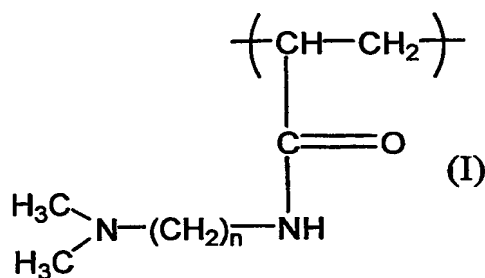
【0011】

1. カチオン性基を有する繰返し単位 (A) 及び糖を含有する繰返し単位 (B) を有する糖含有共重合体 (但し、下記一般式 (I) 及び (II) で表される繰返し単位を有し、(I) と (II) のモル比率が 1 : 9 ~ 9 : 1 であって、且つ、重量平均分子量が $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^8$ である糖含有共重合体を除く。) を用いて形成される核酸分子送達用担体。

一般式 (I) :

【0012】

【化1】



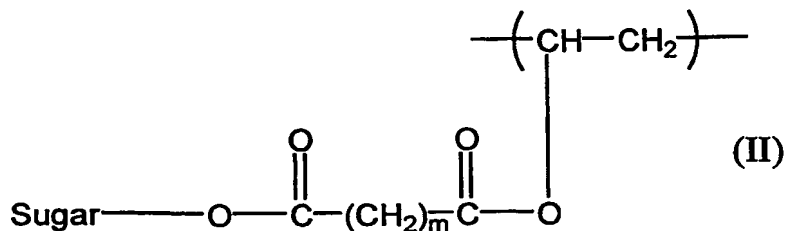
【0013】

(式中、n は 1 ~ 10 を示す。)

一般式 (II) :

【0014】

【化2】



【0015】

(式中、Sugar は糖から 1 個の NH₂ もしくは OH を除いた糖残基を示し、m は 2 ~ 10 を示す。)

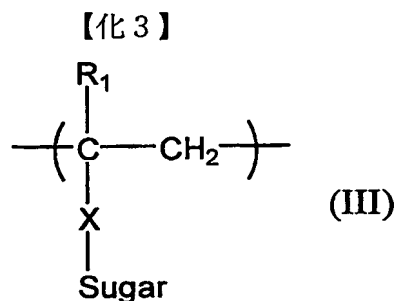
2. カチオン性基を有する繰返し単位 (A)、糖を含有する繰返し単位 (B) 及び疎水性置換基を有する繰返し単位 (C) を有する糖含有共重合体を用いて形成される核酸分子送達用担体。

【0016】

3. 糖を含有する繰返し単位 (B) が、下記一般式 (III) で表される繰返し単位である項 1 又は 2 に記載の核酸分子送達用担体。

一般式 (III) :

【0017】



【0018】

(式中、 R_1 は、 $-H$ 又は $-CH_3$ を示す。

Sugarは糖から1個の NH_2 もしくは OH を除いた糖残基を示す。

X は、 $-C(=O)O-$ 、 $-C(=O)O-R_a-$ 、 $-CONH-$ 、 $-CONH-R_b-$ 、 $-OC(=O)-R_c-C(=O)O-$ 、又は $-Ph-R_d-O-$ を示す。ここで、

R_a は $-Ph-O-$ 、又は $-(CH_2)_{n_a}-O-$ を示す。 n_a は1~10を示す。

R_b は $-Ph-O-$ 、又は $-(CH_2)_{n_b}-O-$ を示す。 n_b は1~10を示す。

R_c は $-(CH_2)_{n_c}-$ 、又は $-(CH_2)_{n_c}-Ph-(CH_2)_{n_c}-$ を示す。 n_c は2~18を示す。

R_d は $-CH_2-$ 、又は $-SO_2-$ を示す。

Ph はフェニレン基を示す。)

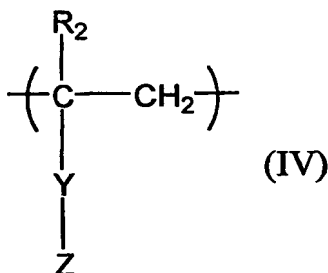
【0019】

4. カチオン性基を有する繰り返し単位(A)が、下記一般式(IV)で表される繰り返し単位である項1~3のいずれかに記載の核酸分子送達用担体。

一般式(IV)：

【0020】

【化4】



【0021】

(式中、 R_2 は、 H 又は CH_3 を示す。

【0022】

Y は、 $-C(=O)O-(CH_2)_{n_y}-$ 、 $-OC(=O)-(CH_2)_{n_y}-$ 、 $-OC(=O)-(CH_2)_{n_y}-C(=O)-$ 、又は $-CONH-(CH_2)_{n_y}-$ を示す。 n_y は1~10を示す。

【0023】

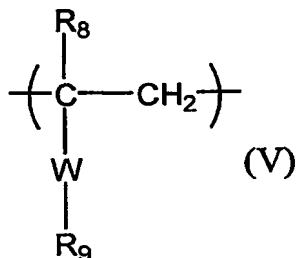
Z は、 $-NR_3R_4$ (R_3 及び R_4 は、各々同一または異なって炭素数1~10の炭化水素基を示す。)、 $-N^+R_5R_6R_7$ (R_5 、 R_6 及び R_7 は、各々同一または異なって炭素数1~10の炭化水素基を示す。)、又は窒素含有複素環式基を示す。)

5. 疎水性置換基を有する繰り返し単位(C)が、下記一般式(V)で表される繰り返し単位である項2~4のいずれかに記載の核酸分子送達用担体。

一般式(V)：

【0024】

【化5】



【0025】

(式中、 R_8 は、 $-H$ 又は $-CH_3$ を表す。

W は $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)-(CH_2)_{n_w}-C(=O)O-$ 、又は $-C(=O)NH$ を表す。 n_w は1~18を表す。

R_9 は、炭素数3~30の炭化水素基を表す。)

【0026】

6. 糖含有共重合体における繰返し単位(A)と繰返し単位(B)のモル比率が $A:B=1:99 \sim 99:1$ である項1~5のいずれかに記載の核酸分子送達用担体。

【0027】

7. 糖含有共重合体における繰返し単位(A)+繰返し単位(B)に対する繰返し単位(C)のモル比率が $A+B:C=99.9:0.1 \sim 0.1:99.9$ である項2~6のいずれかに記載の核酸分子送達用担体。

【0028】

8. 糖含有共重合体の重量平均分子量が1万~100万である項1~7のいずれかに記載の核酸分子送達用担体。

【0029】

以下、本発明について具体的に説明する。

【0030】

本発明の核酸分子送達用担体は、カチオン性基を有する繰返し単位(A)及び糖を含有する繰返し単位(B)を有する糖含有共重合体、或いは、繰返し単位(A)及び(B)に加えて、更に疎水性置換基を有する繰返し単位(C)を有する糖含有共重合体により形成される。

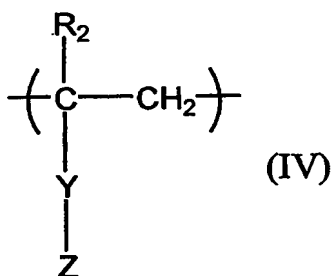
【0031】

カチオン性基を有する繰返し単位(A)

カチオン性基を有する繰返し単位の構造は所望に応じて適宜設定し得るが、本発明においては、下記一般式(IV)で表される構造であることが好ましい。

【0032】

【化6】



【0033】

(式中、 R_2 は、 $-H$ 又は $-CH_3$ を表す。

Y は、 $-C(=O)O-(CH_2)_{n_y}-$ 、 $-OC(=O)-(CH_2)_{n_y}-$ 、 $-OC(=O)-(CH_2)_{n_y}-C(=O)-$ 、又は $-CONH-(CH_2)_{n_y}-$ を表す。 n_y は1~

10、好ましくは2～5、より好ましくは2～4、特に3を表す。

【0034】

Zは、 $-NR_3R_4$ (R_3 及び R_4 は、各々同一または異なって炭素数1～10の炭化水素基を示す。)、 $-N^+R_5R_6R_7$ (R_5 、 R_6 及び R_7 は、各々同一または異なって炭素数1～10の炭化水素基を示す。)、又は窒素含有複素環式基を示す。)

$R_3 \sim R_7$ で表される炭化水素基としては、直鎖状又は分岐状の飽和炭化水素基又は不飽和炭化水素基、或いは環式炭化水素基等が挙げられる。環式炭化水素基としては、芳香族炭化水素基、脂環式炭化水素基等が挙げられる。炭化水素基としては具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基などが挙げられる。

【0035】

窒素含有複素環式基としては、例えば、ピロリジニル、ピペリジル、ピペリジノ、ピペラジニル、N-メチルピペラジノ、モルホリノ、ピロリル、イミダゾリル、ピリジル、ピリミジニル、イミダゾリジニル、キノリル、イソキノリル等が挙げられる。

【0036】

該繰り返し単位は、カチオン性基を有する単量体を重合することによって得ることができる。

【0037】

カチオン性基を有する単量体としては、例えば、

$CH_2=CH-C(=O)O-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$ 、 $CH_2=CH-C(=O)O-(CH_2)_3-N^+(CH_3)_3$ 、 $CH_2=CH-OC(=O)-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$ 、 $CH_2=CH-OC(=O)-(CH_2)_3-N^+(CH_3)_3$ 、 $CH_2=CH-CONH-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$ 、 $CH_2=CH-OC(=O)-(CH_2)_3-C(=O)O-N(CH_3)_2$ 、 $CH_2=CH-OC(=O)-(CH_2)_3-C(=O)O-N(CH_2CH_3)_2$ などが挙げられる。

【0038】

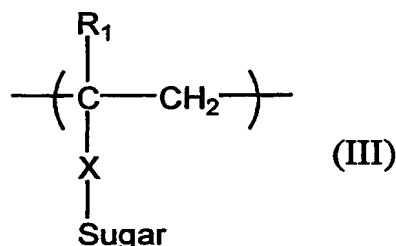
糖を含有する繰り返し単位 (B)

糖を含有する繰り返し単位の構造は所望に応じて適宜設定し得るが、特に下記一般式 (III) で表される構造のものが好適に用いられる。

一般式 (III) :

【0039】

【化7】



【0040】

(式中、 R_1 は、 $-H$ 又は $-CH_3$ を示す。

Sugarは糖から1個の NH_2 もしくは OH を除いた糖残基を示す。

X は、 $-C(=O)O-$ 、 $-C(=O)O-R_a-$ 、 $-CONH-$ 、 $-CONH-R_b-$ 、 $-OC(=O)-R_c-C(=O)O-$ 、又は $-Ph-R_d-O-$ を表す。ここで、

R_a は $-Ph-O-$ 、又は $-(CH_2)_{n_a}-O-$ を表す。 n_a は1～10を表す。

R_b は $-Ph-O-$ 、又は $-(CH_2)_{n_b}-O-$ を表す。 n_b は1～10を表す。

R_c は $-(CH_2)_{n_c}-$ 、又は $-(CH_2)_{n_c}-Ph-(CH_2)_{n_c}-$ を表す。 n_c は2～18を表す。

R_d は $-CH_2-$ 、又は $-SO_2-$ を表す。

Ph はフェニレン基を表す。)

【0041】

一般式 (I I I) において「Sugar」は、糖（単糖、二糖、多糖）から1個のNH₂（アミノ糖の場合）または1個のOH（アミノ糖以外の大部分の糖の場合）を除いた糖残基を示す。該糖残基(Sugar)がOH基で結合する場合、ヘキソースの場合にはアノマー炭素（1位）または2位の水酸基、或いは6位の1級水酸基結合し、ヘキソース以外にもこれらに対応する位置で結合する。また、該糖残基(Sugar)がNH₂基で結合する場合、例えばグルコサミン、ガラクトサミン、マンノサミンなどNH₂基の結合している炭素は通常2位である。

【0042】

Sugarは、Sugar-(OH)で表される糖とSugar-(NH₂)で表されるアミノ糖の両方を含む。

【0043】

Sugar-(OH)で表される糖の種類は特に限定されず、例えば、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース等の単糖、スクロース、マルトース、ラクトース等の二糖、デンプン、セルロース等の多糖及び多糖の加水分解生成物などが挙げられる。それらは天然糖でも合成糖でもよい。

【0044】

Sugar-(NH₂)で表されるアミノ糖としては、グルコサミン、ガラクトサミン、マンノサミン、ノイラミン酸等の単糖、或いはこれらアミノ単糖を有する二糖ないし多糖が例示される。

【0045】

糖の種類は核酸分子送達用担体を適する生物試料の種類に応じて適宜設定し得る。例えば、肝実質細胞のように、ガラクトースレセプターが存在する細胞に遺伝子を導入する場合には、ガラクトースが好適に用いられる。

【0046】

糖を含有する繰り返し単位 (B) は、糖含有単量体を重合することにより得ることができる。

【0047】

糖含有単量体としては、例えば、ビニルアジポイル-D-ガラクトース (vinyladipoyl-D-Galactose)、ビニルアジポイル-D-グルコース (vinyladipoyl-D-Glucose)、アクリロイルガラクトース、アクリロイルグルコース、ビニルセバシルグルコース、アジポイルマンノース等が挙げられる。

【0048】

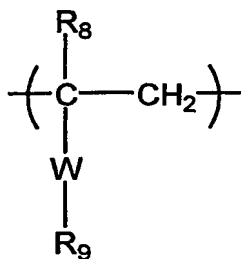
疎水性置換基を有する繰り返し単位 (C)

疎水性置換基を有する繰り返し単位の構造は所望に応じて適宜設定し得るが、特に下記一般式 (V) で表される構造のものが好適に用いられる。

一般式 (V)

【0049】

【化8】



【0050】

(式中、R₈は、-H又は-CH₃を表す。

Wは-C(=O)O-、-OC(=O)-、-OC(=O)-(CH₂)_n-C(=O)

O-、又は-C(=O)NHを表す。 n_w は1~18を表す。

R_9 は、炭素数3~30、好ましくは5~30、より好ましくは10~20の炭化水素基を表す。)

【0051】

R_9 の炭化水素基としては、直鎖状又は分岐状の飽和炭化水素基又は不飽和炭化水素基、或いは環式炭化水素基等が挙げられる。環式炭化水素基としては、芳香族炭化水素基、脂環式炭化水素基等が挙げられる。具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、 $-C_6H_5$ 等が挙げられる。またコレステリル基等が挙げられる。

【0052】

疎水性置換基を有する繰り返し単位(C)は、疎水性置換基を有する単量体を重合することにより得ることができる。

【0053】

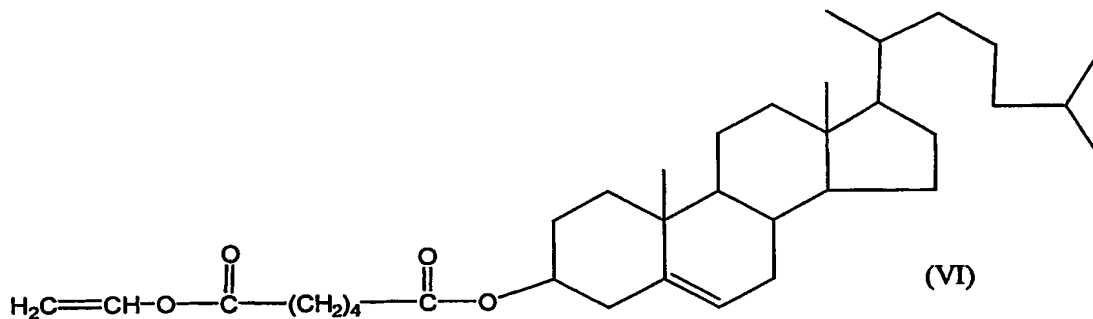
疎水性置換基を有する単量体としては、例えば、炭素数10~20の高級脂肪酸のアクリル酸エステル、炭素数10~20の高級脂肪酸のビニルエステル、コレステロール環を有するビニル単量体等が挙げられる。より具体的には、ステアリルアクリレートや下記一般式(VI)で表されるコレステロール環を有するビニル単量体等が例示できる。

【0054】

一般式(VI)

【0055】

【化9】



【0056】

糖含有共重合体

本発明における、繰り返し単位(A)及び繰り返し単位(B)を有する糖含有共重合体は、カチオン性基を有する単量体及び糖含有単量体を共重合することによって、得ることができる。また、本発明における、繰り返し単位(A)、繰り返し単位(B)及び繰り返し単位(C)を含有する共重合体は、カチオン性基を有する単量体、糖含有単量体及び疎水性置換基を有する単量体を共重合させることによって、得ることができる。

【0057】

各単量体を共重合する方法としては、公知の方法を適宜用いることができる。例えば、重合開始剤を用いるラジカル重合により行うことができる。

【0058】

重合開始剤としては、通常のラジカル重合開始剤を用いることができ、例えば、アゾイソブチルニトリル(AIBN)等のアゾ系開始剤や有機過酸化物などを使用することができる。

【0059】

糖含有共重合体における各繰り返し単位のリモル比率は、所望の性質を有する糖含有共重合体又は核酸分子送達用担体を得ることを目的として、適宜設定することができる。

【0060】

通常、繰り返し単位(A)と繰り返し単位(B)とのリモル比率は、 $A:B=1:99\sim99:1$ 程度、好ましくは、 $30:70\sim70:30$ 程度である。

【0061】

また、繰り返し単位 (C) を有する場合、繰り返し単位 (A) と繰り返し単位 (B) の総和に対する繰り返し単位 (C) のモル比率は、 $A+B:C=99.9:0.1\sim0.1:99.9$ 程度、好ましくは $99.5:0.5\sim0.5:99.5$ 程度である。

【0062】

糖含有共重合体の分子量は、所望に応じて適宜設定し得るが、通常、重量平均分子量で1万～100万程度、好ましくは1.5万～5万、より好ましくは2万～5万程度である。

【0063】

また、本発明の糖含有共重合体には、本発明の目的の範囲内で、繰り返し単位 (A)、(B) 又は (C) 以外の他の繰り返し単位や構成単位を含めてもよい。

【0064】

核酸分子送達用担体

本発明の核酸分子送達用担体は、上記本発明の糖含有共重合体を用いて形成される。

【0065】

該核酸分子送達用担体における糖含有共重合体が、静電的作用によって核酸分子を凝縮し、核酸分子と複合体を形成する。この複合体が細胞に取り込まれ、核酸分子が細胞内に送達されることとなる。

【0066】

糖含有共重合体と核酸分子との複合体を形成する方法は、公知の方法により適宜行うことができるが、例えば、核酸分子を含有する溶液と、糖含有共重合体を含有する溶液を混合することによって、調整することができる。

【0067】

複合体における糖含有共重合体と核酸分子の比率は、糖含有共重合体のカチオン基のモル数 (C) のDNA又はRNAのリン酸基のモル数 (A) に対する比率 (以下、これをC/A比と言う) で表して、通常0.5以上であり、1.0以上が好ましく、さらに1.5以上が好ましい。

【0068】

細胞には、高分子量のタンパク質などを細胞膜の一部で包み込んで取り入れるエンドサイトーシスという現象が存在することが知られている。エンドサイトーシスには、リガンドに対する特異性がない液相エンドサイトーシスとレセプターが介在したエンドサイトーシス (RME) がある。前者は非特異的であり取込速度が遅いため細胞内への物質輸送としては有用性が低い、後者は低濃度のリガンドを認識して効率よく細胞内に取り込むためにこの機構を利用した核酸分子用送達担体の応用性は高い。RMEは、肝臓、腎臓、小腸、肺、筋肉、脂肪細胞、胎盤あるいは赤血球、白血球繊維など、多くの細胞に存在する機構であることが知られている。それぞれの細胞によってリガンドは異なっているが、肝臓実質細胞のガラクトースやN-アセチルガラクトサミン介在性の取込みや肝臓非実質細胞のマンノース介在性の取込みが良く知られている。本発明の核酸分子送達用担体は、このようなレセプターを介在したエンドサイトーシス (RME) による核酸分子送達に、特に適したものである。

【0069】

本発明の核酸分子送達用担体により運ばれる核酸分子の種類は特に限定されず、例えば、DNA又はRNAなどが挙げられる。より具体的には、特定の蛋白質をコードする遺伝子やアンチセンスDNA、プラスミド、当該遺伝子を含む発現コンストラクト、iRNAなどが挙げられる。

【0070】

本発明の核酸分子用送達担体は、特に遺伝子の送達用担体として好適に用いることができる。本発明の核酸分子用送達担体により運ばれた遺伝子は、細胞内に送達された後、高い効率で遺伝子発現が行われる。

【発明の効果】

【0071】

下記の結果に示されるように、本発明の糖含有共重合体から形成される核酸分子送達用担体は、高い遺伝子発現効率を示すことが明らかになった。

【0072】

本発明の核酸分子送達用担体は、細胞の取り込み機構に応じて、核酸分子を細胞内に適切に導入することができるものであって、レセプターを介在したエンドサイトーシスによる核酸分子送達に特に適している。

【0073】

レセプターを介在したエンドサイトーシスにより取り込まれた複合体（核酸分子と糖含有共重合体と complex）は、核内への移行性が高く、本発明の核酸分子送達用担体によって、核酸分子の核内への送達、特に効率よく行われる。

【0074】

また、本発明の核酸分子送達用担体は、特に遺伝子の送達用担体として好適に用いることができる。本発明の核酸分子送達用担体により運ばれた遺伝子は、細胞内に送達された後、高い効率で遺伝子発現が行われる。特に、本発明の核酸分子送達用担体において、疎水性置換基を有する繰り返し単位を有する糖含有共重合体から形成されるものは、DNA 解離能が高く、細胞内に取り込まれた遺伝子の遺伝子発現を特に効率よく行うことができる。

【0075】

本発明の核酸分子送達用担体はこのように優れた特性を備えたものであって、各種細胞への遺伝子導入に有効に利用し得るものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0076】

以下、実施例、実験例及び比較例を用いて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されることはない。

【0077】

例 1:

ポリ(ジメチルアミノプロピルアクリルアミド-co-6-0-ビニルアジポイル-D-ガラクトース)
Poly(dimethylaminopropylacrylamide-co-6-o-vinyladipoil-D-galactose)
又はポリ(ジメチルアミノプロピルアクリルアミド-co-6-0-ビニルアジポイル-D-グルコース)
Poly(dimethylaminopropylacrylamide-co-6-o-vinyladipoil-D-glucose)を用いて形成された核酸分子送達用担体による遺伝子発現例。

【0078】

(1-1) 糖含有共重合体の合成

Poly(dimethylaminopropylacrylamide-co-6-o-vinyladipoil-D-galactose) (ポリ(ジメチルアミノプロピルアクリルアミド-co-6-0-ビニルアジポイル-D-ガラクトース)) を以下のように作成した。

【0079】

DMA PAA (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド) と 6-0-vinyladipoyl-D-galactose (6-0-ビニルアジポイル-D-ガラクトース) をモノマーとして用い、2,2-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylbaleonitrile) (AMDVN) を開始剤として 1.0mol% 加え、Dimethylsulfoxide (DMSO) を溶媒として全量を 1ml とした。密栓できる、すりつき試験管にそれらを仕込み、三方コックで栓をして液体窒素で凍結させてから、試験管内を三回窒素置換させた。これをもう一度室温に戻して融解させ、再び凍結させて窒素置換を繰り返した。この操作を合計三回繰り返し行った後、凍結させずにそのまま真空ラインを用いて脱気した。その後、真空状態で 60℃ のウォーターバスに 4 時間浸し、反応させた。4 時間後、分子量 1 万カットの透析膜に入れ、純水中室温で 24 時間透析した。24 時間後、エッペンに入れて凍結乾燥し、ポリマー粉末を得た。DMA PAA と 6-0-vinyladipoyl-D-galactose のモノマーの仕込み比は、20 : 80, 35 : 65, 50 : 50, 65 : 35, 80 : 20 (単位は全て mol%) とし、各場合について、同様の操作を行った。

【0080】

得られたガラクトース含有共重合体の分子量、繰り返し単位のモル比及び収率を以下の表1に示す。以下、ポリマーにおける繰り返し単位のモル比は、 $^1\text{H-NMR}$ 測定によって求められる積分値によって計算した。 $^1\text{H-NMR}$ 測定は、乾燥したポリマーを10mgはかり採り、 $700\mu\text{l}$ の D_2O に溶かして200MHzの $^1\text{H-NMR}$ 装置を用いて行った。また、ポリマーの重量平均分子量は、GPC測定により、乾燥したポリマーの濃度5mg/ml溶液をそれぞれ調製し、 $1/15\text{M}$ リン酸バッファー($\text{pH}=7.42$)を移動相として流速0.5ml/min、カラム温度 40°C で $20\mu\text{l}$ インジェクトして、pullulanを標準サンプルとして用いて、測定した。

【0081】

【表1】

Poly(dimethylaminopropylacrylamide-co-6'-o-vinyladipoyl-D-galactose)の合成

試料	仕込み比(mol%) DMPAA : D-galactose	分子量 ($\times 10^3$)	重合後の繰り返し単位モル比(mol%) DMPAA:D-galactose	収率 (%)
D28gal72	20:80	31	28:72	10
D42gal58	35:65	30	42:58	21
D56gal44	50:50	29	56:44	25
D69gal31	65:35	26	69:31	33
D80gal20	80:20	22	80:20	39

【0082】

また、ガラクトース含有単量体に代えて、グルコース含有単量体(6-0-vinyladipoyl-D-gulucose (6-0-ビニルアジポイル-D-グルコース))を用いる以外は、上記と同様にして、グルコース含有共重合体を得た。

【0083】

得られたグルコース含有共重合体の分子量、及び繰り返し単位のモル比を以下の表2に示す。

【0084】

【表2】

Poly(dimethylaminopropylacrylamide-co-6'-o-vinyladipoyl-D-glucose)の合成

試料	仕込み比(mol%) DMPAA : D-glucose	分子量 ($\times 10^3$)	重合後の繰り返し単位モル比(mol%) DMPAA:D-glucose	収率 (%)
D20glu80	20:80	32	20:80	27
D40glu60	35:65	30	40:60	28
D50glu50	50:50	29	50:50	30
D66glu34	65:35	25	66:34	42
D79glu21	80:20	22	79:21	39

【0085】

(1-2) 核酸分子と糖含有共重合体との複合体の形成と確認

核酸分子として、プラスミドpCMV-Lucを用いた。上記(1-1)で作成した糖含有共重合体2.4mgを $1000\mu\text{l}$ のD-MEM培地に溶解してストック溶液を作製した。このストック溶液 $5\mu\text{l}$ とpCMV-Luc溶液 $45\mu\text{l}$ (pCMV-Lucを100ng含有)を混合することで、C/A比=50とした。ストック溶液を段階希釈し、同濃度のpCMV-Luc溶液と混合して、C/A比の異なる試料溶液(C/A比=0.5、1、1.5、2、3、4、5)を調製した。

【0086】

種々のC/A(Cation/Anion)比で混合した糖含有共重合体と核酸分子との複合体(Complex)形成は、次のように、0.8%アガロースゲル電気泳動を用いることによって確認した。E

thydium bromide (EtBr) を含む $0.5 \times$ TBE 溶液を用いて 0.8% アガロースゲルを作製した。C/A = 0.5、1、1.5、2、3、4 及び 5 のポリマー (D40glu60, D42gal58) 溶液 $10 \mu\text{l}$ 、pCMV-Luc (200ng/ μl) $1 \mu\text{l}$ 及び BPB 溶液 $2 \mu\text{l}$ を混合して $13 \mu\text{l}$ とし、 37°C で 30 分間放置した。30 分後、サンプルをスロットにアプライし、泳動バッファーを $0.5 \times$ TBE with EtBr とし、 100V で 30 分間電気泳動した。

【0087】

(1-3) 複合体による遺伝子発現実験

肝細胞 HepG2 細胞と腎上皮細胞 COS-1 細胞に対する、pCMV-Luc-ガラクトース含有ポリマー複合体と pCMV-Luc-グルコース含有ポリマー複合体を用いた場合における遺伝子発現効率と C/A 比の関係を調べた。

【0088】

遺伝子発現効率は、以下のように測定した。

【0089】

核酸分子送達用担体としては、上記 (1-2) で作製したプラスミド DNA (pCMV-Luc) と糖含有共重合体 (D40glu60, D42gal58) との複合体、即ち、pCMV-Luc-ガラクトース含有ポリマー (Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose) (D42gal58) 複合体と、pCMV-Luc-グルコース含有ポリマー (Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose) (D40glu60)) 複合体を用いた。

【0090】

核酸分子を送達する細胞としては、ヒトの肝癌細胞である HepG2 細胞とミドリザルの腎上皮細胞である COS-1 細胞を用いた。

【0091】

96well plate に 1×10^4 cells/well ずつ播種して接着させた COS-1 細胞と HepG2 細胞に、complex を $50 \mu\text{l}$ /well 添加し、 $200 \mu\text{M}$ クロロキン溶液 (FBS free) を $50 \mu\text{l}$ /well 添加して 8 時間インキュベートさせた。8 時間後、PBS で洗浄して、D-MEM (10% FBS) を $100 \mu\text{l}$ /well 添加し、さらに 40 時間インキュベートさせた。40 時間後、PBS で洗浄して細胞溶解液 (Triton X-100 など) $50 \mu\text{l}$ /well を添加し、 37°C で 30 分間放置後、それを $20 \mu\text{l}$ ずつ取り出して蛍光基質液 (ATP, D-Luciferin などを含む) $100 \mu\text{l}$ 入ったビンに入れ、ミルカウンターで Luciferase 活性によって細胞への遺伝子発現効率を測定した。

【0092】

肝細胞 HepG2 細胞に対する結果を図 1 (A) に、腎上皮細胞 COS-1 細胞に対する結果を図 1 (B) に示す。

【0093】

その結果、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose) を用いた核酸分子送達用担体は、ガラクトースレセプターを有する肝細胞 HepG2 細胞において高い遺伝子発現効率を示すことが明らかになった (図 1 (A))。また発現効率は、C/A = 1.5 ~ 2 で高い値を示していた。一方、COS 細胞に対する同様の実験を行った結果では、取り込み促進は見られなかった (図 1 (B))。HepG2 細胞にはガラクトースレセプターが存在するが、COS 細胞にはガラクトースレセプターが存在しないため、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose) は、ガラクトースレセプターに基づくレセプター介在により細胞特異的に遺伝子を発現できた可能性が高いと考えられた。

【0094】

これに対し、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose) を用いた核酸分子送達用担体は、HepG2 細胞においては、取込促進作用が見られなかったが、COS 細胞においては、取込促進作用が認められた (図 1 (A) 及び (B))。

【0095】

(1-4) 細胞に対する毒性評価

また、DC protein 法によるタンパク定量を行うことによって細胞への毒性も検討した。タンパク定量は Lowry 法に基づいて行った。

【0096】

各ポリマー (Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose) (D42gal58) 及び (Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose) (D40glu60)) について毒性の比較を行った結果を図2に示す。細胞が死んだ場合、プレートから細胞が剥がれ落ちるため、タンパク量は減るが、図2に示されるように、どちらのポリマーを用いた実験でも総タンパク量は変化しなかった。この結果、どちらのポリマーもほとんど毒性はなく、毒性による発現効率への影響はないと考えられた。

【0097】

(1-5) 糖添加による競争阻害実験

次いで、遺伝子の取込みがガラクトースレセプター介在によるものであるかを確認する為に 上記(1-3)の遺伝子発現実験において、D-galactose を添加して、糖添加による競争阻害実験を行うことにした。Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose)がガラクトースレセプターを介してHepG2細胞へ導入されているならば、ガラクトースレセプターに対してD-galactose の結合が競合するために、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose)がレセプターに結合しにくくなり、D-galactose添加により、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose)のHepG2細胞への遺伝子発現効率は下がると考えられる。

【0098】

実験には、高い遺伝子発現効率を示したPoly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose)のC/A = 2のものを用いた。

【0099】

糖添加による競争阻害実験は以下のように行った。

【0100】

96wellplate に 1×10^4 cells/well ずつ播種して接着させたCOS-1細胞とHepG2細胞に、種々の濃度のD-galactose、あるいはD-glucose を $5 \mu\text{l/well}$ 加え、プラスミドDNA(pCMV-Luc)とポリマーとのcomplexを $50 \mu\text{l/well}$ 添加した。そこへ、 $200 \mu\text{M}$ クロロキン溶液(FBS free)を $55 \mu\text{l/well}$ 添加して8時間インキュベートした。8時間後、PBSで洗浄して、D-MEM(10%FBS)を $100 \mu\text{l/well}$ 添加し、さらに40時間インキュベートした。Luciferase活性測定を測定することによって遺伝子発現効率を調べた。

【0101】

HepG2細胞へのPoly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose) (D42Gal58) の遺伝子発現効率におけるガラクトース添加による競争阻害実験の結果を図3に示す。

【0102】

その結果、図3に示されるようにガラクトース添加によってPoly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose)のHepG2細胞への遺伝子発現効率は20%程度にまで減少した。

【0103】

(1-6) RIによる遺伝子の取込位置の測定

次に、糖添加の存在における遺伝子の取り込みの仕組みにおいて、遺伝子が核内へ取り込まれているのか、細胞質に留まっているのかを明らかにするために、糖添加による競争阻害条件下での32P-pCMV-Luc活性を測定し、核への取り込み量を調べた。糖添加による競争阻害条件は、上記(1-5)と同様にした。

【0104】

(1) 32P-pCMV-Lucのラベル化

ニクトランレーション法により α -dCTP-32PをpCMV-Lucにラベル化した。

【0105】

(2) 32P-pCMV-Lucによる取り込み量測定

液体シンチレーションカウンターによって細胞内へ導入された32P-pCMV-Lucの放射能活性を測定し、核及び細胞質内への取り込み量測定を行った。96well plate に 1×10^4 cells/well ずつ播種して接着させたCOS-1細胞とHepG2細胞へ、様々な濃度のD-galactose、あるいはD-glucoseを加え、形成させた32P-pCMV-Lucとポリマー(D40glu60, D42gal58)とのcomplexを $50 \mu\text{l/well}$ 添加した。そこへ、 $200 \mu\text{M}$ クロロキン溶液(FBS free)を $50 \mu\text{l/well}$ 添加して8時間インキュベートした。8時間後、PBS溶液で洗浄し、トリプシン溶液を添加し

て細胞を剥離させた後、SDS溶液を添加して細胞を溶解した。遠心分離後、上清と沈殿とを分け、それぞれ液体シンチレーションカクテルへ入れて、液体シンチレーションカウンタによって細胞内へ導入された³²P-pCMV-Lucの放射能活性を測定した。このときの上清を細胞質 (Cytoplasm) への取り込み量、沈殿を核 (Nuclear) への取り込み量とした。

【0106】

図4にPoly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose) (D42Gal58) を用いたcomplexによるHepG2細胞への遺伝子取り込みとガラクトースの影響を調べた結果を示す。

【0107】

図4に示されるように、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose)の核内取り込みは、HepG2細胞においてC/A比が高くなるにつれて取り込み量も増加していた。また、細胞質内への取り込み量も、C/A比が高くなるにつれて上昇していた。

【0108】

前記図1の実験結果に示されるように、遺伝子の発現効率は、C/Aで最高値になっている。これに対し、図4の実験結果に示されるように、細胞内への遺伝子取り込み量は、C/A > 1.5においても増加している。この結果から、発現効率と、ポリマーと遺伝子の複合体の取り込みには、単純な相関関係がなりたないものと考えられた。

【0109】

また、D-galactoseを添加することによってPoly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose)を用いた場合における、³²P-pCMV-Lucの取り込み量の減少がみられた。

【0110】

このように、ガラクトース添加により細胞への遺伝子取り込み量が減少している結果は、HepG2細胞におけるPoly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose)を用いた遺伝子取り込みが、ガラクトースレセプター介在性の取り込みであることを示すものと考えられた。

【0111】

また、図5にPoly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose) (D40glu60) を用いたcomplexによるHepG2細胞へのDNA取り込みとグルコースの影響を調べた結果を示す。

【0112】

図5に示されるように、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose)は、HepG2細胞においてC/A比が高くなるにつれて細胞内への取り込み量は増加したが、核への取り込みは低い値を示した。

【0113】

また、D-glucoseを添加することにより、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose)を用いた場合における、³²P-pCMV-Lucの取り込み量はあまり変化しなかった。

【0114】

このことから、HepG2細胞におけるPoly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose)を用いた場合の遺伝子取り込みは、ガラクトースレセプター介在性のエンドサイトーシスではなく、細胞の非特異的な取り込みであるエンドサイトーシスにより取り込まれているものと考えられた。

【0115】

糖の種類による取り込みの機構の違いについて明瞭にするために、図6にHepG2細胞におけるPoly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose) (D42Gal58) とPoly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose) (D40Glu60) により導入した遺伝子の細胞質への取り込み量、そして、核への取り込み量の比率について、C/A比が異なる場合の結果を図示した。

【0116】

この結果から、D40Glu60によりレセプターを介さずに細胞質内に取り込まれたと考えられる遺伝子は、C/A比の違いに関わらず、ほとんどが細胞質に留まり、核への移行性が低いことが分かった。一方、D42Gal58によりガラクトースレセプターを介して取り込まれたと考えられる遺伝子は、C/A比の違いに関わらず、ほとんどが細胞質から核へ移行することが分かった。この結果から、レセプター介在型によるエンドサイトーシスにより取り込

まれた複合体 (complex) は、核内への移行性が高いと考えられた。

【0117】

例 2:

Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose-co-stearyl)又はPoly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose-co-stearyl)を用いて形成された核酸分子送達用担体における遺伝子発現例。

【0118】

遺伝子の細胞内への取り込み量の増加にともなう、遺伝子発現効率も増加すると考えていたが、図 1 及び図 4 に表される実験結果に示されるように、遺伝子取り込み量と遺伝子発現効率との間には相関性が見られないことが明らかになった。これは、C/A比が上昇するにつれて取り込み量は増加する一方で、DNA-ポリマー複合体 (ポリプレックス) から DNA が解離しにくくなり、そのため、転写・翻訳も困難になり、その結果、遺伝子の発現効率も低下する可能性が考えられた。そこで、アニオン分子によるポリプレックスからの DNA の解離を検討した (図 7 参照)。そして、疎水性置換基を有する単量体を用いて共重合体を合成することによって、ポリマーの形状を変化させることにより、ポリプレックスからの DNA の解離の変化を調べてみることにした。

【0119】

すなわち、カチオン性繰り返し単位及び糖含有繰り返し単位を有するポリマーに、更に疎水性置換基である stearyl 基を有する繰り返し単位を導入した共重合体、具体的には、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose-co-stearyl) と Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose-co-stearyl) を合成し、これらのポリマーを用いることによって、アニオン分子によるポリプレックスからの DNA の解離能と遺伝子の発現効率との相関性を比較した。

【0120】

(2-1) Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose-co-stearyl) と Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose-co-stearyl) の合成

カチオン性基を有する単量体として DMAPAA、糖を含有する単量体として 6-0-vinyladipoyl-D-glucose 又は 6-0-vinyladipoyl-D-galactose、そして、疎水性置換基を有する単量体として ステアリル アクリレート (stearylacrylate) を用い、実験例における共重合体の合成と同様の方法で重合反応を行った。モノマー全体の濃度を $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol}$ とし、モノマーの仕込み比を DMAPAA : 6-0-vinyladipoyl-D-glucose (又は 6-0-vinyladipoyl-D-galactose) : stearylacrylate = 35 : 65 : 1 (単位は全て mol%) とした。開始剤 2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile) (AMDVN) を 1.0 mol% 加えて、DMSO を溶媒として全量を 1 ml とした。密栓できる、すり付き試験管にそれらを仕込み、三方コックで栓をして液体窒素で凍結させてから、試験管内を三回窒素置換させた。これをもう一度室温に戻して融解させ、再び凍結させて窒素置換を繰り返す。この操作を合計三回繰り返して行った後、凍結させずにそのまま真空ラインでひいて脱気した。その後、真空状態で 60℃ のウォーターバスに 4 時間浸し、反応させた。4 時間後、分子量 1 万カットの透析膜に入れ、純水中室温で 24 時間透析した。24 時間後、エッペンに入れて凍結乾燥した。

【0121】

得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のモル比及び収率について、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose-co-stearyl) は表 3 に、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose-co-stearyl) は表 4 に示す。

【0122】

【表 3】

Poly(DMAPAA-co-6-O-vinyladipoyl-D-galactose-co-stearyl)の合成

試料	仕込み比(mol%) DMPAA : D-galactose : stearyl	分子量 ($\times 10^3$)	重合後の繰り返し単位モル比 (mol%) DMPAA : D-galactose : stearyl	収率 (%)
D50gal49s1	35 : 65 : 1	29	50 : 49 : 1	23

【0123】

【表 4】

Poly(DMAPAA-co-6-O-vinyladipoyl-D-glucose-co-stearyl)の合成

試料	仕込み比(mol%) DMPAA : D-glucose : stearyl	分子量 ($\times 10^3$)	重合後の繰り返し単位モル比 (mol%) DMPAA : D-glucose : stearyl	収率 (%)
D38glu61s1	35 : 65 : 1	33	38 : 61 : 1	24

【0124】

(2-2) DNA解離能の確認

Poly(DMAPAA-o-6-O-vinyladipoyl-D-galactose-co-stearyl) (D50gal49s1) と DNA との complex、及び Poly(DMAPAA-o-6-O-vinyladipoyl-D-glucose (D38glu61s1)) と DNA との complex に、アニオン分子である potassium polyvinyl Sulfate Solution (PVSK) を添加し、complex からの DNA の解離能をアガロースゲル電気泳動によって確認した。すなわち、Poly(DMAPAA-o-6-O-vinyladipoyl-D-galactose-co-stearyl) と DNA (pCMV-Luc) との complex (C/A 比=0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 10) と Poly(DMAPAA-o-6-O-vinyladipoyl-D-galactose) と DNA (pCMV-Luc) との complex (C/A 比=0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 10) を各 $5\mu\text{l}$ ずつとり、 $1\mu\text{l}$ の pCMV-Luc ($200\mu\text{g}/\mu\text{l}$) と混合して、 37°C で 30 分間放置したものに、等モル量の PVSK を各 $3.88\mu\text{l}$ 添加し、 37°C で 30 分間放置した。コントロールとして $1\mu\text{l}$ の pCMV-Luc ($200\mu\text{g}/\mu\text{l}$) に D-MEM を $5\mu\text{l}$ 、TE を $3.88\mu\text{l}$ 添加したものと、 $1\mu\text{l}$ の pCMV-Luc ($200\mu\text{g}/\mu\text{l}$) に各 C/A 比のポリマー溶液を $5\mu\text{l}$ 、TE を $3.88\mu\text{l}$ 添加したものを、電気泳動した。

【0125】

(2-3) Poly(DMAPAA-co-6-O-vinyladipoyl-D-galactose-co-stearyl) (D50gal49s1) を用いた遺伝子発現効率の測定

DNA の解離能と遺伝子の発現効率との相関性を確認する為に、D50gal49s1 を用いて遺伝子導入を行うこととした。プラスミド DNA (pCMV-Luc) とポリマーとの complex を形成させた。96well plate に 1×10^4 cells/well ずつ播種して接着させた COS-1 細胞と HepG2 細胞へ、complex を $50\mu\text{l}$ /well 添加し、 $200\mu\text{M}$ クロロキン溶液 (FBS free) を $50\mu\text{l}$ /well 添加して 8 時間インキュベートさせた。8 時間後、PBS で洗浄して、D-MEM (10% FBS) を $100\mu\text{l}$ /well 添加し、さらに 40 時間インキュベートさせた。40 時間後、PBS で洗浄して細胞溶解液 (Triton X-100 など) $50\mu\text{l}$ /well 添加し、 37°C で 30 時間放置後、それを $20\mu\text{l}$ ずつ取り出して発光基質液 (ATP, D-Luciferin など) $100\mu\text{l}$ 入ったビンに入れ、ミルカウンターで Luciferase 活性による細胞への遺伝子発現効率を測定した。

【0126】

同様に、Poly(DMPAA-co-6-o-vinyladipoyl-D-galactose) (D42gal58)、Poly(DMPAA-co-6-o-vinyladipoyl-D-glucose) (D40glu60)、Poly(DMAPAA-co-6-o-vinyladipoyl-D-glucose-co-stearyl) (D38glu61s1) の共重合体を用いて遺伝子発現効率の測定を行った。

【0127】

具体的には、上記 4 種の共重合体と pCMV-Luc との複合体により Hep 2 細胞への遺伝子取り込みを行った場合のルシフェラーゼの発現効率と C/A 比の関係を調べた。結果を図 8 に示す。

【0128】

図 8 に示される結果から、Poly(DMAPAA-co-6-O-vinyladipoyl-D-galactose) (D42Gal58

)を用いた場合には、核への移行性はC/A比の上昇にしたがって向上するが、C/A=1.5で発現効率がピークになることがわかった。

【0129】

一方、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose-co-stearyl)を用いた場合には、C/A比が高くなるにつれてHepG2細胞における遺伝子の取り込み量も増加した。

【0130】

このことから、HepG2細胞におけるガラクトース含有共重合体を用いた遺伝子送達の場合、遺伝子取り込みの量はC/A比の上昇に伴って向上するが、DNAを解離しにくい場合には、C/A=1.5で遺伝子の発現効率がピークになってしまうことが示唆された。

【0131】

(2-4) アニオン分子の添加によるDNAの解離

さらに、pCMV-Luc-Gal58 (pCMV-Luc-D42Gal58) 複合体及びpCMV-Luc-Gal49(s) (pCMV-Luc-D50Gal49s1) 複合体からのPVS (Poly(vinylsulfate)) 存在下での遺伝子の遊離を調べた。遺伝子の遊離は、上記(2-2) DNA解離能の確認と同様の方法で行った。結果を図9に示す。

【0132】

C/A=1.5の時、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose) (D42gal58)は、アニオン分子を添加していない時はスロット内に留まっているが、アニオン分子を添加するとDNAが解離し、スロットから流れだしたバンドを確認することができた。C/A=2では、解離して流れ出したDNAのバンドを確認することはできるが、C/A=1, 1.5の時のバンドと比べると、非常に薄くなっていた。さらにC/A比が上昇すると、解離してスロットから流れ出したDNAのバンドを確認することはできなかった。このことから、発現効率がC/A=1.5のとき最高値を示すのは、やはりこのDNAの解離能と関係があるのではないかと示唆される。一方、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose-co-stearyl) (D50gal49s1)では、C/A=10のときでも、アニオン分子を添加することによって、解離してスロットから流れ出したDNAを確認することができた。

【0133】

これらの結果から、DNAの解離能が発現効率と関係があるのならば、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose-co-stearyl)を用いることによって、C/A比の上昇に伴って発現効率も上昇すると考えられる。

例3: 糖含有共重合体の合成

(1) メチルガラクトシド含有ポリマー

Poly(DMAPA-co-6-0-vinyladipoyl-methyl-D-galactoside-co-stearylacrylate)

カチオン性基を有する単量体としてDMAPA (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)、糖を含有する単量体として6-0-vinyladipoyl-methyl-D-galactoside、そして、疎水性置換基を有する単量体としてstearylacrylate (ステアリルアクリレート)を用いた。単量体全体の濃度を $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol}$ とし、仕込み比をそれぞれカチオン性基: 糖: 疎水性=50:50:1 (単位はすべてmol%)とした。開始剤2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile) (AMDVN)を1 mol%加えて、DMSOを溶媒としてガラスアンプル中で全量を1mlとした。脱気封かんし、60℃で24時間反応した。分子量1万カットの透析膜に入れ、純水中室温で24時間透析し、凍結乾燥した。得られたパウダーをアセトンで洗浄し、真空下乾燥しポリマーを得た。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のモル比及び収率については下の表に示す。

Poly(DMAPA-co-6-0-vinyladipoyl-methyl-D-galactoside-co-vinylstealate)

カチオン性基を有する単量体としてDMAPA (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)、糖を含有する単量体として6-0-vinyladipoyl-methyl-D-galactoside、そして、疎水性置換基を有する単量体としてvinylstealate (ステアリン酸ビニルエステル)を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のモル比及び収率については下の表に示す。

Poly(DMAPA-co-6-O-vinyladipoyl-methyl-D-galactoside-co-vinylpalmitate)

カチオン性基を有する単量体として DMAPA (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)、糖を含有する単量体として 6-O-vinyladipoyl-methyl-D-galactoside、そして、疎水性置換基を有する単量体として vinylpalmitate (パルミチン酸ビニルエステル) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のモル比及び収率については下の表に示す。

Poly(DMAEA-co-6-O-vinyladipoyl-methyl-D-galactoside-co-stearyl)

カチオン性基を有する単量体として DMAEA (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)、糖を含有する単量体として 6-O-vinyladipoyl-methyl-D-galactoside、そして、疎水性置換基を有する単量体として stearylacrylate (ステアリルアクリレート) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のモル比及び収率については下の表に示す。

Poly(DMAEA-co-6-O-vinyladipoyl-methyl-D-galactoside-co-vinylstealate)

カチオン性基を有する単量体として DMAEA (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)、糖を含有する単量体として 6-O-vinyladipoyl-methyl-D-galactoside、そして、疎水性置換基を有する単量体として vinylstealate (ステアリン酸ビニルエステル) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のモル比及び収率については下の表に示す。

Poly(DMAEA-co-6-O-vinyladipoyl-methyl-D-galactoside-co-vinylpalmitate)

カチオン性基を有する単量体として DMAEA (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)、糖を含有する単量体として 6-O-vinyladipoyl-methyl-D-galactoside、そして、疎水性置換基を有する単量体として vinylpalmitate (パルミチン酸ビニルエステル) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のモル比及び収率については下の表に示す。

(2) マンノース含有ポリマー

Poly(DMAPA-co-6-O-vinyladipoyl-D-mannose-co-stearylacrylate)

カチオン性基を有する単量体として DMAPA (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)、糖を含有する単量体として 6-O-vinyladipoyl-D-mannose、そして、疎水性置換基を有する単量体として stearylacrylate (ステアリルアクリレート) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のモル比及び収率については下の表に示す。

Poly(DMAPA-co-6-O-vinyladipoyl-D-mannose-co-vinylstealate)

カチオン性基を有する単量体として DMAPA (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)、糖を含有する単量体として 6-O-vinyladipoyl-D-mannose、そして、疎水性置換基を有する単量体として vinylstealate (ステアリン酸ビニルエステル) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のモル比及び収率については下の表に示す。

Poly(DMAPA-co-6-O-vinyladipoyl-D-mannose-co-vinylpalmitate)

カチオン性基を有する単量体として DMAPA (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)、糖を含有する単量体として 6-O-vinyladipoyl-D-mannose、そして、疎水性置換基を有する単量体として vinylpalmitate (パルミチン酸ビニルエステル) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のモル比及び収率については下の表に示す。

Poly(DMAEMA-co-6-O-vinyladipoyl-D-mannose-co-stearylacrylate)

カチオン性基を有する単量体として DMAEMA (ジメチルアミノエチルメタアクリレート)

、糖を含有する単量体として6-0-vinyladipoyl-D-mannose、そして、疎水性置換基を有する単量体としてstealateacrylate (ステアリルアクリレート) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のリモル比及び収率については下の表に示す。

Poly(DMAEMA-co-6-0-vinyladipoyl-D-mannose-co-vinylstealate)

カチオン性基を有する単量体としてDMAEMA (ジメチルアミノエチルメタアクリレート)、糖を含有する単量体として6-0-vinyladipoyl-D-mannose、そして、疎水性置換基を有する単量体としてvinylstealate (ステアリン酸ビニルエステル) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のリモル比及び収率については下の表に示す。

Poly(DMAEMA-co-6-0-vinyladipoyl-D-mannose-co-vinylpalmitate)

カチオン性基を有する単量体としてDMAEMA (ジメチルアミノエチルメタアクリレート)、糖を含有する単量体として6-0-vinyladipoyl-D-mannose、そして、疎水性置換基を有する単量体としてvinylpalmitate (パルミチン酸ビニルエステル) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のリモル比及び収率については下の表に示す。

(3) マルトース含有ポリマー

Poly(DMAEA-co-6-0-vinyladipoyl-D-maltose-co-stearylacrylate)

カチオン性基を有する単量体としてDMAEA (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)、糖を含有する単量体として6-0-vinyladipoyl-D-maltose、そして、疎水性置換基を有する単量体としてstealateacrylate (ステアリルアクリレート) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のリモル比及び収率については下の表に示す。

Poly(DMAEA-co-6-0-vinyladipoyl-D-maltose-co-vinylstealate)

カチオン性基を有する単量体としてDMAEA (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)、糖を含有する単量体として6-0-vinyladipoyl-D-maltose、そして、疎水性置換基を有する単量体としてvinylstealate (ステアリン酸ビニルエステル) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のリモル比及び収率については下の表に示す。

Poly(DMAEA-co-6-0-vinyladipoyl-D-maltose-co-vinylpalmitate)

カチオン性基を有する単量体としてDMAEA (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)、糖を含有する単量体として6-0-vinyladipoyl-D-maltose、そして、疎水性置換基を有する単量体としてvinylpalmitate (パルミチン酸ビニルエステル) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のリモル比及び収率については下の表に示す。

(4) トレハロース含有ポリマー

Poly(DMAEMA-co-6-0-vinyladipoyl-D-trehalose-co-stearylacrylate)

カチオン性基を有する単量体としてDMAEMA (ジメチルアミノエチルメタアクリレート)、糖を含有する単量体として6-0-vinyladipoyl-D-trehalose、そして、疎水性置換基を有する単量体としてstealateacrylate (ステアリルアクリレート) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のリモル比及び収率については下の表に示す。

Poly(DMAEMA-co-6-0-vinyladipoyl-D-trehalose-co-vinylstealate)

カチオン性基を有する単量体としてDMAEMA (ジメチルアミノエチルメタアクリレート)、糖を含有する単量体として6-0-vinyladipoyl-D-trehalose、そして、疎水性置換基を有する単量体としてvinylstealate (ステアリン酸ビニルエステル) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のモル比及び収率については下の表に示す。

Poly(DMAEMA-co-6-0-vinyladipoyl-D-trehalose-co-vinylpalmitate)

カチオン性基を有する単量体としてDMAEMA (ジメチルアミノエチルメタアクリレート)、糖を含有する単量体として6-0-vinyladipoyl-D-trehalose、そして、疎水性置換基を有する単量体としてvinylpalmitate (パルミチン酸ビニルエステル) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のモル比及び収率については下の表に示す。

(5) グルコース含有ポリマー

Poly(DMAPA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose-co-vinyladipoyl-cholesterol)

カチオン性基を有する単量体としてDMAPA (ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)、糖を含有する単量体として6-0-vinyladipoyl-D-mannose、そして、疎水性置換基を有する単量体としてvinyladipoyl-cholesterol (3-ビニルアジポイルコレステロール) を用い、上と同様の方法で反応した。得られたポリマーの分子量、繰り返し単位のモル比及び収率については下の表に示す。

【0134】

3-ビニルアジポイルコレステロールはコレステロールとアジピン酸ジビニルを用いたエステル交換反応で合成した。すなわち、コレステロール4.85gをジオキサン40mlに溶かし、ジビニルアジピン酸ビニル5mlを加え、キャンディダアンタークティカリパーゼ (Novozyme435) 2.5gを添加し40℃で1週間攪拌した。不溶物をろ過で除いた後、反応液を濃縮しシリカゲルカラムを用いてヘキサンで溶出し目的物を得た。

【0135】

【表5】

糖含有共重合体の合成 (仕込み比(mol%)、カチオン性基:糖:疎水性=50:50:1)

	試料	分子量 ($\times 10^3$)	重合後の繰り返し 単位モル比(mol%) (カチオン:糖:疎水性)	収率 (%)
メチル β -ラクトシド	Poly(MeGal6VA-DMAEA-SA)	16	76:21:3.1	53
	Poly(MeGal6VA-DMAEA-SV)	17	76:22:2.1	53
	Poly(MeGal6VA-DMAEA-PV)	17	75:23:1.6	52
	Poly(MeGal6VA-DMAPA-SA)	24	66:32:1.8	37
	Poly(MeGal6VA-DMAPA-SV)	24	68:31:0.9	42
	Poly(MeGal6VA-DMAPA-PV)	24	67:32:0.9	48
マンノース	Poly(Man-DMAPA-SA)	19	52:47:1	20
	Poly(Man-DMAPA-SV)	17	48:51:0.9	38
	Poly(Man-DMAPA-PV)	18	45:53:1.2	39
	Poly(Man-DMAEMA-SA)	40	60:39:1	56
	Poly(Man-DMAEMA-SV)	47	60:39:0.3	60
	Poly(Man-DMAEMA-PV)	46	60:40:0.4	58
マルトース	Poly(Mal-DMAEA-SA)	24	58:39:2.4	45
	Poly(Mal-DMAEA-SV)	21	56:42:1.7	68
	Poly(Mal-DMAEA-PV)	21	55:44:1	70
トレハロース	Poly(Tre-DMAEMA-SA)	31	67:33:0.4	71
	Poly(Tre-DMAEMA-SV)	32	67:32:0.4	65
	Poly(Tre-DMAEMA-PV)	33	69:31:0.3	74
グルコース	Poly(Glu-DMAPA-CholV)	25	53:48:1	20

SA: stealateacrylate (ステアリルアクリレート)、SV: vinylstealate (ステアリン酸ビニルエステル)、PV: vinylpalmitate (パルミチン酸ビニルエステル)、CholV: vinyladipoyl-cholesterol (3-ビニルアジポイルコレステロール)

【図面の簡単な説明】

【0136】

【図1】図1は、(A)HepG2細胞へのpCMV-Lucと糖含有共重合体との複合体、及び(B)COS細胞へのpCMV-Lucと糖含有共重合体との複合体による、ルシフェラーゼの発現効率とC/A比の関係を調べた結果を示す図面である。PEIはポリエチレンジイミン (Polyethyleneimine) を示す。

【図2】図2は、DC protein法によるタンパク定量を行うことによって、ポリマーの細胞に対する毒性を検討した結果を示す図面である。

【図3】図3は、HepG2細胞への遺伝子発現効率に及ぼすガラクトースの影響を調べた結果を示す図面である。Poly-Galはガラクトース含有共重合体、Poly-gluはグルコース含有共重合体、PEIはポリエチレンジイミン (Polyethyleneimine) を用いた場合を示す。

【図4】図4は、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose)によるHepG2細胞へのDNA取り込みとガラクトースの影響を調べた結果を示す図面である。(A)は核内、(B)は細胞質内に対する取り込みの検討結果を示す。図4においてSugarはガラクトースを示す。

【図5】図5は、Poly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose)によるHepG2細胞へのDNA取り込みとグルコースの影響を調べた結果を示す図面である。(C)は核内、(D)は細胞質内に対する取り込みの検討結果を示す。図5においてSugarはグルコースを示す。

【図6】図6は、HepG2細胞に対しPoly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-galactose)及びPoly(DMAPAA-co-6-0-vinyladipoyl-D-glucose)により導入した遺伝子の核移行性

の割合を示した図面である。

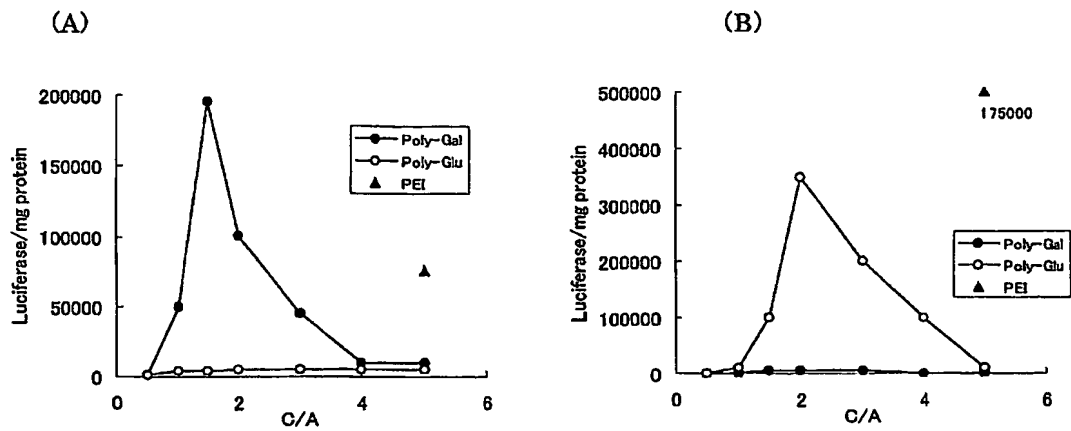
【図 7】図 7 は、アニオン分子によるポリプレックスからの DNA の解離をモデル化した図面である。

【図 8】図 8 は pCMV-Luc と各種糖含有共重合体との複合体を用いた場合における HepG 2 細胞へのルシフェラーゼの発現効率と C/A 比の関係を示した図面である。

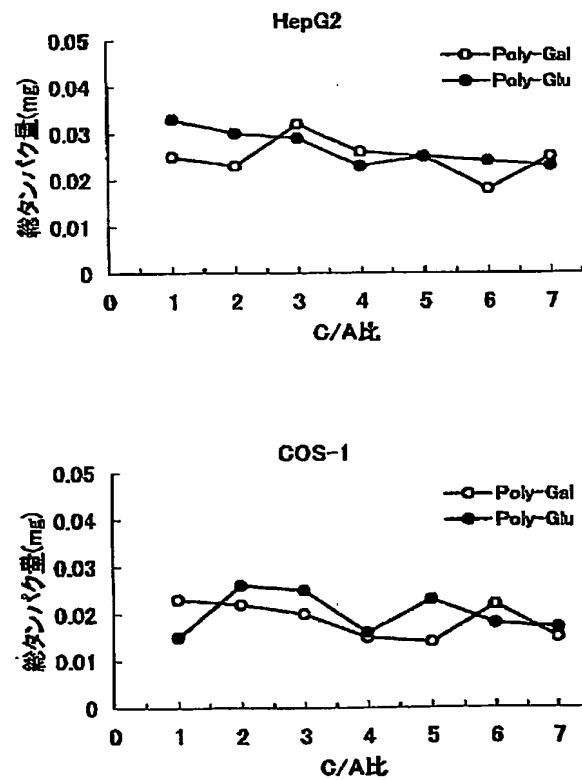
【図 9】図 9 は、ガラクトース含有共重合体と pCMV-Lu との複合体の PVS 存在下での遺伝子の遊離に関する図面である。

【書類名】 図面

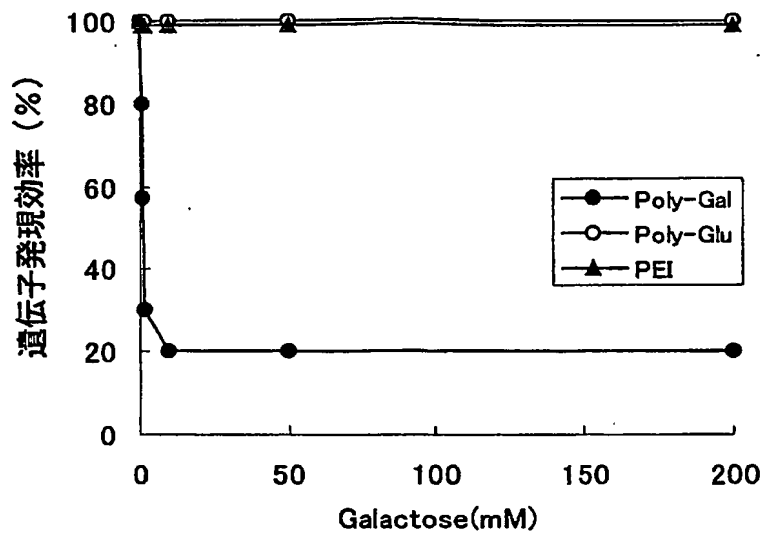
【図 1】



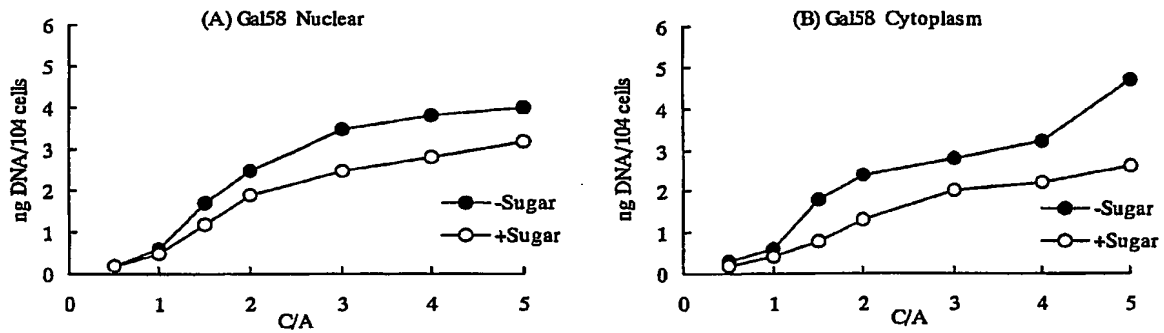
【図 2】



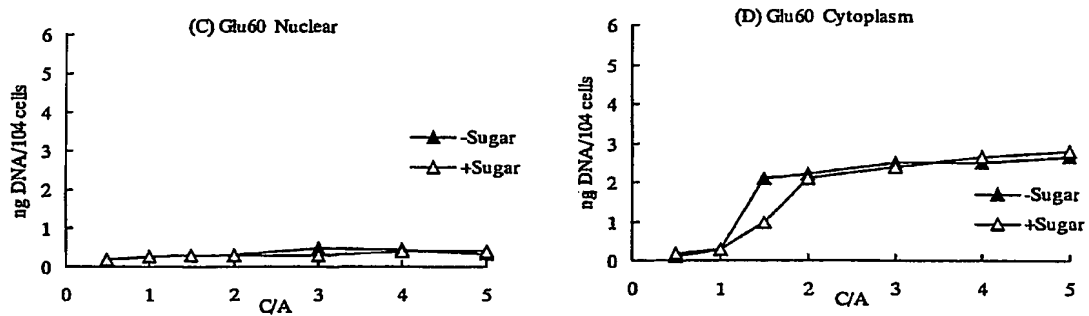
【図 3】



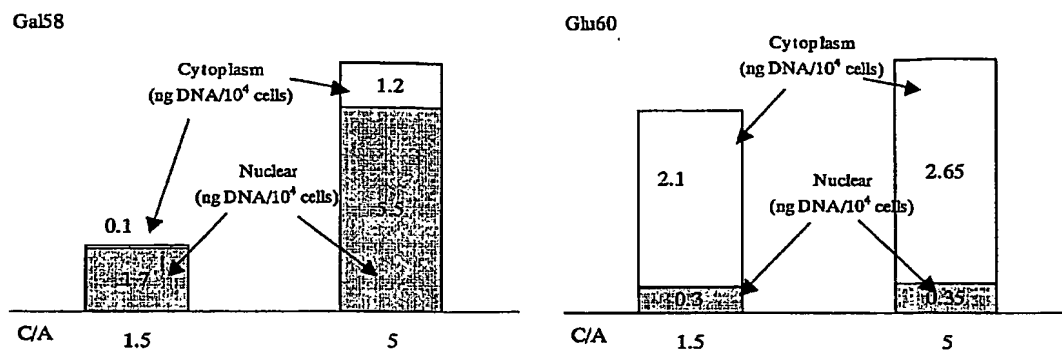
【図 4】



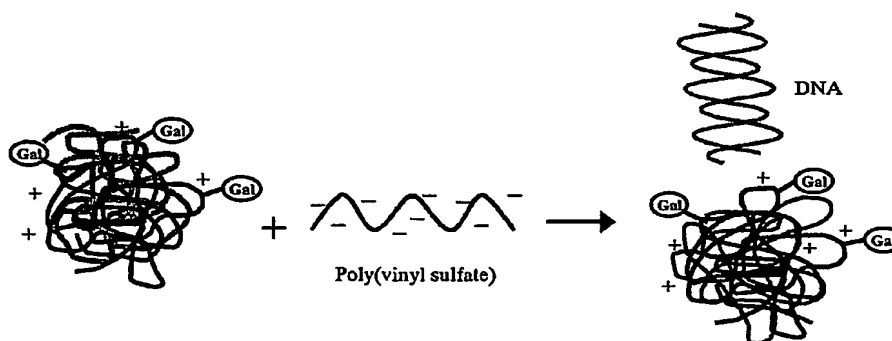
【図 5】



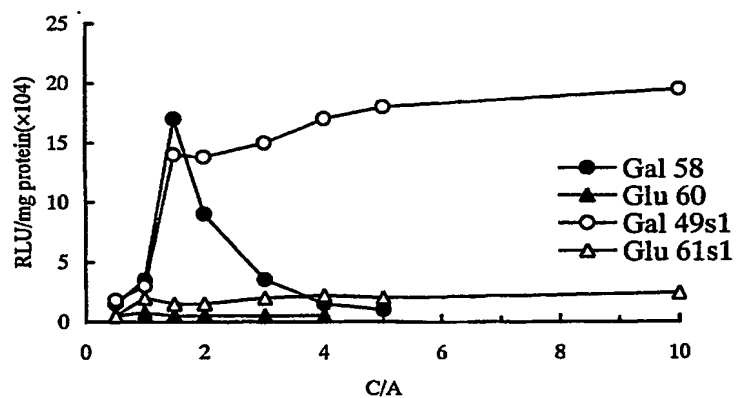
【図 6】



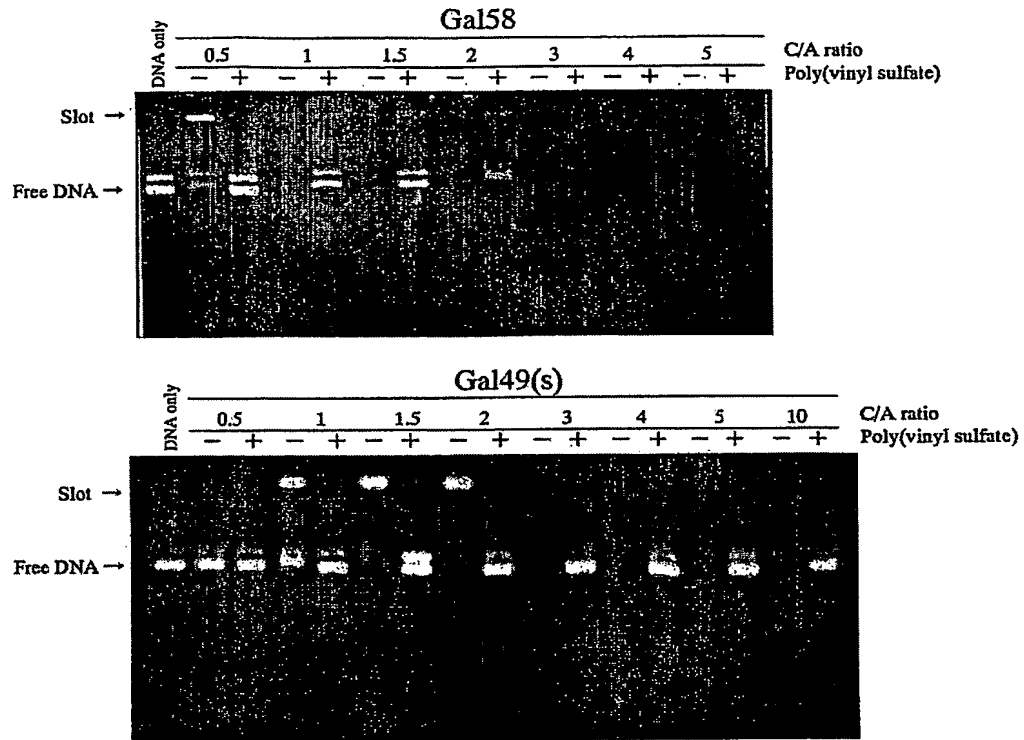
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遺伝子発現効率に優れた核酸分子送達用担体を提供すること。

【解決手段】 カチオン性基を有する繰り返し単位（A）及び糖を含有する繰り返し単位（B）を有する糖含有共重合体を用いて形成される核酸分子送達用担体。更に、（A）及び（B）に加え、疎水性置換基を有する繰り返し単位（C）を有する糖含有共重合体から形成される核酸分子送達用担体。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-138734
受付番号	50400766047
書類名	特許願
担当官	楠本 眞 2169
作成日	平成 16 年 10 月 20 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

502224098

【住所又は居所】

京都府京都市左京区松ヶ崎御所海道町 京都工芸
繊維大学繊維学部高分子学科内

【氏名又は名称】

山岡 哲二

【特許出願人】

【識別番号】

301021533

【住所又は居所】

東京都千代田区霞が関 1-3-1

【氏名又は名称】

独立行政法人産業技術総合研究所

【特許出願人】

【識別番号】

000003160

【住所又は居所】

大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号

【氏名又は名称】

東洋紡績株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100065215

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜
T N K ビル 三枝国際特許事務所

【氏名又は名称】

三枝 英二

【選任した代理人】

【識別番号】

100076510

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜
T N K ビル 三枝国際特許事務所

【氏名又は名称】

掛樋 悠路

【選任した代理人】

【識別番号】

100086427

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜
T N K ビル 三枝国際特許事務所

【氏名又は名称】

小原 健志

【選任した代理人】

【識別番号】 100099988
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜
T N K ビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 斎藤 健治
【選任した代理人】
【識別番号】 100105821
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜
T N K ビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 藤井 淳
【選任した代理人】
【識別番号】 100099911
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜
T N K ビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 関 仁士
【選任した代理人】
【識別番号】 100108084
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜
T N K ビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】 中野 睦子

特願 2004-138734

出願人履歴情報

識別番号

[502224098]

1. 変更年月日

2002年 6月21日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市左京区松ヶ崎御所海道町 京都工芸繊維大学繊維
学部高分子学科内

氏 名

山岡 哲二

特願 2004-138734

出願人履歴情報

識別番号 [301021533]

1. 変更年月日	2001年 4月 2日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関1-3-1
氏 名	独立行政法人産業技術総合研究所

特願 2 0 0 4 - 1 3 8 7 3 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 3 1 6 0]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号

氏 名

東洋紡績株式会社